

VU Research Portal

The DNA double helix challenged by force

Gross, P.

2011

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Gross, P. (2011). *The DNA double helix challenged by force*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse Samenvatting

De DNA dubbele helix gestresst door kracht

DNA speelt zonder enige twijfel een centrale rol in het leven: het bevat de genetische code voor al het leven om ons heen. Elk DNA heeft exact dezelfde chemische structuur; slechts de genetische informatie is verschillend van organisme tot organisme. Deze informatie is gecodeerd in de sequentie van de nucleotiden. Deze nucleotiden kunnen worden beschouwd als de bouwstenen van het DNA. Er zijn slechts vier verschillende nucleotiden beschikbaar voor elk organisme. Het alfabet van het leven bevat dus vier letters: A, T, G en C (elk een afkorting van een nucleotide). Deze nucleotiden vormen een streng, zoals kralen aan een ketting. Twee van deze strengen vormen samen een nieuwe complexe structuur, een vervlochten spiraal, de bekende dubbele DNA-helix.

DNA speelt de centrale rol in dit proefschrift. Wat u wellicht zal verbazen is dat deze genetische code niet in het middelpunt van het onderzoek staat. In dit werk heb ik met verschillende DNA-moleculen gewerkt, maar nooit bespreek ik de genen in deze moleculen. Is dat niet vreemd? Tegenwoordig lijken de twee woorden DNA en gen onafscheidelijk. Welke genen er in het DNA zitten dat wij onderzocht hebben, lijkt volkomen genegeerd te worden. Onvermijdelijk rijst de vraag: "Waarom, als je onderzoek aan DNA doet, bestudeer je iets anders dan de genetische informatie verborgen in het molecuul? De genetische code bevat toch het boek des levens... niet?"

Om deze vraag te kunnen beantwoorden, zullen we moeten kijken naar wat er bekend is over de genetische informatie in het DNA. De vraag hoe we het Boek van het Leven moeten lezen, heeft mensen al sinds de ontdekking ervan gefascineerd. Tien jaar na de voltooiing van de sequentie van het menselijk genoom leerden we dat het lezen van de sequentie (de volgorde van de basen) niet het antwoord is. Je kunt de Code van het Leven niet lezen zoals een boek. Het DNA bevat genen, stukken code die vertaald worden naar eiwitten. Deze eiwitten zijn kleine moleculen, elk gespecialiseerd in een specifiek doel. Sommige worden door de cel gemaakt om voedingsstoffen te verwerken; andere eiwitten vormen receptoren in het celmembraan, om de omgeving van de cel in de gaten te houden; weer andere controleren het DNA continu op fouten, om deze vervolgens te repareren. En dat zijn nog maar enkele van de vele taken die eiwitten uitvoeren in elke cel. Eiwitten zijn de belangrijkste bouwsteen van het leven. Als je water wegdenkt, bestaat de helft van het gewicht van een cel uit eiwitten. DNA, met de genetische code die erin ligt opgeslagen, bepaalt welke eiwitten geproduceerd worden. Als je een gen nu ziet als een woord, wat is dan de structuur

van de genetische informatie? Voor ons ziet het DNA eruit als een woordenboek van zo'n 20.000 woorden, elk met een voetnoot die uitlegt wanneer het woord gebruikt dient te worden. Al die voetnoten verwijzen naar elkaar in een complex netwerk.

Het begint duidelijk te worden dat deze 'voetnoten' een centrale rol in het leven spelen. Ze zetten genen aan en uit, of beïnvloeden de precieze dosering ervan, en bepalen zo de genexpressie. Dit heeft een enorme invloed op de verschijningsvorm van het leven.

De aansturing van de genetische informatie ligt, anders dan die genetische informatie zelf, niet simpelweg besloten in de volgorde van de basen. Ook de mechanische eigenschappen en de stabiliteit van het DNA hebben een directe invloed op de genexpressie. RNA-polymerases, eiwitten die de genetische code lezen, kunnen lokaal de dubbele helix van het DNA ontvouwen. De TATA-box is een sequentiemotief dat een belangrijke rol speelt bij de start van genexpressie. Het is een stuk DNA dat weinig structurele stabiliteit heeft, waardoor het makkelijk ontvouwen kan worden door RNA-polymerase. Ook de dosering van genexpressie kan direct beïnvloed worden door de mechanische eigenschappen van het DNA. Een eiwit dat fungeert als aan/uit-knop voor bepaalde spijsverteringsenzymen van de bacterie *E. Coli*, vormt een lus in het DNA door met zijn twee armen twee stukken van het DNA vast te grijpen. Deze lus, gevormd door het Lac repressoreiwit, laat soms los. Hoe kleiner de afstand tussen de stukjes DNA waar de twee armpjes binden (de grootte van de lus), hoe moeilijker het is voor het Lac repressoreiwit om deze lus in stand te houden, wat de efficiëntie van de uit-knop vermindert. De grootte van de lus bepaalt dus direct hoe veel eiwit er wordt gemaakt in de cel.

De mechanische eigenschappen van DNA - hoe moeilijk het bijvoorbeeld is om de dubbele helix te openen om bij de genetische code te kunnen, of hoe lang je een gen uit kunt zetten door het vormen van een compacte lus - hebben een directe invloed op de manier waarop de genetische code wordt gebruikt.

Vandaag de dag, tien jaar na het ontcijferen van de genetische code, staan we voor een nieuwe uitdaging: het maken van een alomvattend beeld van genexpressie. Hiervoor is een volledig begrip van de mechanische eigenschappen van DNA essentieel. In deze samenvatting zal ik een overzicht geven van alles wat we tot nu toe weten over de fysische eigenschappen van DNA; daarnaast introduceer ik een aantal nog openstaande vragen, en vertel ik hoe mijn werk heeft bijgedragen aan het opvullen van een aantal wetenschappelijke hiaten.

Enkele eigenschappen van DNA-moleculen

DNA is een molecuul dat lijkt op een touw met een zeer kleine diameter. Het heeft een diameter van 0,000 000 002 meter, ongeveer 20.000 tot 40.000 maal dunner dan een menselijke haar. Dit terwijl het langste menselijke chromosoom een lengte heeft van ongeveer 10 cm. De complexe structuur van DNA (de dubbele helix) is van fundamenteel belang voor het DNA. Eiwitten, de werkpaarden van de cel, zijn zo geëvolueerd dat ze precies om de dubbele helix van het DNA passen.

Veel van de fundamentele taken die uitgevoerd worden door eiwitten, gebeuren door een fysieke manipulatie. Zo wordt, vlak voordat celdeling plaatsvindt, het DNA gekopieerd. Dit proces wordt mogelijk gemaakt door moleculaire motoren, helicases genaamd, die de twee strengen van het DNA uit elkaar ritsen. Een andere klasse motoren fabriceert de twee complementaire strengen. Nog meer manipulatie vindt plaats wanneer de DNA-code wordt afgelezen. Bij dit proces breken gespecialiseerde moleculaire motoren, RNA-polymerases, het DNA lokaal open om de ingeprente code te bereiken.

Het DNA-molecuul dient dus aan twee criteria te voldoen: de driedimensionale structuur dient ten eerste stevig te zijn, maar moet ten tweede ook geopend en gesloten kunnen worden zonder dat dit te veel moeite kost. Op welke wijze kunnen we iets leren over het DNA? Hoe kunnen we de stevigheid van de dubbele helix bestuderen en iets leren over het punt waarop het DNA zijn dubbele-helixstructuur verliest? Als DNA zo groot zou zijn als een touw, zodat je het vast zou kunnen pakken, dan zou je er aan kunnen trekken om te voelen of het flexibel en meegaand is, of stevig en inelastisch. Je zou ook kunnen bekijken hoe de structuur van het touw verandert als je er hard aan trekt. Deze aanpak, het manipuleren en het toepassen van mechanische belasting waarna je bekijkt wat de respons is, beschrijft grootendeels de experimentele methodes beschreven in dit proefschrift.

Manipulatie van DNA op de nano-schaal

DNA is klein; de diameter bevindt zich in de nanometerschaal, wat al erg klein klinkt. Een nanometer is ongeveer duizend maal kleiner dan een stofdeeltje. Daarnaast zijn er grenzen aan de stabiliteit van het DNA. Als we, om welke vreemde reden dan ook, een touw zouden willen maken dat sterk genoeg is om een vlo (van ongeveer 0.1 gram) op te tillen, dan dient het touw uit zo'n 15 miljoen DNA-moleculen te bestaan. De techniek die gebruikt wordt in dit proefschrift, en welke gevoelig genoeg is om enkele DNA-moleculen te isoleren en te manipuleren (en dus niet 15 miljoen moleculen),

wordt het **optisch pincet** genoemd. Op de omslag van dit proefschrift is zo'n optisch pincet afgebeeld. Deze techniek maakt gebruik van de minuscule impuls van licht om kleine objecten te verplaatsen en vast te pakken. DNA zelf is echter te klein om direct vast te pakken met een optisch pincet. Daarom worden er bolletjes die zo'n duizend keer groter zijn dan het DNA, vastgeplakt aan de uiteinden van het DNA. Een zo'n bolletje is ook afgebeeld op de omslag. Dit bolletje wordt vastgehouden in een prachtig afgebeeld optisch pincet.

Hoofdstuk 2 van dit proefschrift geeft een technisch overzicht van zogenaamde 'enkel-molecuultechnieken' zoals optische pincetten. Daarnaast beschrijft dit hoofdstuk hoe optische pincetten gecombineerd kunnen worden met fluorescentiemicroscopie. Deze microscopietechniek gebruikt fluorescentie als een speciale 'truc' om objecten te visualiseren die zo klein zijn dat de interactie met het licht niet sterk genoeg is om voldoende contrast te leveren om ze op een conventionele manier te zien.

DNA op het uiterste

Het centrale onderwerp in dit proefschrift is wat er met DNA gebeurt wanneer het onder mechanische spanning staat. Als we wederom naar het omslag kijken en de dubbele-helixstructuur van het DNA bekijken, is het geen verrassing dat mechanische spanning de 'twist' van de dubbele helix verandert. Dit effect is tot dusverre alleen kwalitatief waargenomen. Niet eerder is de kwantitatieve impact op de elastische eigenschappen van DNA bestudeerd.

In hoofdstuk 4 ontwikkelen wij een mathematisch model dat het mogelijk maakt te analyseren hoe het aantal windingen van DNA verandert, door slechts de spanning op het DNA te voelen en de lengte van het molecuul te meten.

In hoofdstuk 3 visualiseren wij wat er met DNA gebeurt wanneer de mechanische spanning verder wordt verhoogd. Bij de minuscule kracht van 65 piconewton (het gewicht van een vlo produceert een ongeveer 15 miljoen keer grotere kracht) valt de dubbele-helixstructuur van DNA uit elkaar. Door fluorescentiefoto's te maken van DNA-moleculen bij deze spanning, zien we iets interessants gebeuren: DNA breekt tijdens zo'n gebeurtenis niet in twee stukken. Onze foto's laten zien dat DNA ontrafelt: de beide strengen van de dubbele helix scheiden op een omkeerbare manier.

In hoofdstuk 4 bestuderen we ook de invloed van de DNA-sequentie op het ontrafelen van de DNA-strengen. We laten zien dat de "vingerafdrukken" van de DNA-sequentie onthuld kunnen worden door het krachtsignaal gedurende dit proces te analyseren.

In hoofdstuk 5 onderzoeken we wat er gebeurt als het DNA aan elkaar "geniet" is, d.w.z. wanneer de strengen niet fysiek uit elkaar gehaald kunnen worden. Door

fluorescentieopnames van zulke DNA-moleculen te maken, zien we dat er, in plaats van een rafelproces vanaf de uiteindes, kleine gebiedjes in het midden ontstaan waar de dubbele helix verdwijnt. Zulke gebiedjes waren al bekend voor DNA waarvan de temperatuur wordt verhoogd: het DNA begint te 'koken'. De gebiedjes worden "smeltbellen" genoemd, naar analogie met kokend water, en ze zijn niet statisch, maar bewegen juist langs het DNA en ontstaan spontaan en verdwijnen ook weer. Interessant genoeg kun je dit proces letterlijk voelen, zoals in hoofdstuk 6 wordt besproken. Hier meten we de trillingen van het DNA onder deze extreme omstandigheden en bestuderen we de dynamica van DNA-smeltbellen.

In hoofdstuk 7 geven we een praktische beschrijving hoe mechanische belasting op DNA gebruikt kan worden om de dubbele helix in enkelstrengs DNA om te zetten. In de cel bestaat het DNA slechts kortstondig in deze exotische toestand. Soms gebeurt het echter, bijvoorbeeld tijdens het kopiëren van het DNA, dat de dubbele helix in twee strengen wordt gescheiden. In dit hoofdstuk laten we zien dat het scheidingsproces ook mechanisch uitgevoerd kan worden, door aan aanzienlijke kracht uit te oefenen. Alles bij elkaar genomen, heb ik met dit proefschrift geprobeerd een vollediger beeld neer te zetten van de manier waarop DNA reageert op mechanische spanning. Dit blijkt een proces te zijn dat een verbazingwekkend niveau van complexiteit bezit.